

(19) Japanese Patent Office

(12) Publication of Unexamined Patent Application (A) (11) *Kokai* Number

2004-201679

(P2004-201679A)

(43) Date of Publication: **July 22, 2004**

(51) Int. Cl. ⁷	FI			Theme Code (Reference)
C12Q 1/68	C12Q 1/68	ZNAA		4B024
C12N 15/09	C12N 15/00	A		4B063

Request for Examination: Not Requested. Number of Claims: 10 OL (15 Pages Total)

(21) Application Number: 2003-403715 (P2003-403715)	(71) Applicant: 000000918 Kao Corporation 1-14-1 Nihonbashi Kayaga-cho Chuo-ku, Tokyo
(22) Filing Date: December 2, 2003	
(31) Priority Application No.: 2002-358698 (P2002-358698)	(74) Agent: 100104499 Tatsuhito Kishimoto, Attorney
(32) Priority Date: December 10, 2002	(74) Agent: 100101203 Akihiko Yamashita, Attorney
(33) Priority Country: Japan (JP)	(74) Agent: 100108800 Testuro Hoshino, Attorney
	(72) Inventor: Tadayuki Iwase c/o Kao Corporation Laboratories 2-1-3 Bunka Sumida-ku, Tokyo

(continued on last page)

(54) [Title of the Invention] Primer for Detecting *Fusobacterium Nucleatum* using PCR and Method for Detection thereof

(57) [Abstract] (Revised)

[Problem] Provide a method of specifically detecting purulent disease related bacteria and *Fusobacterium nucleatum*, which causes bad breath, from a biological sample.

[Means for Solving the Problem] Method of screening and/or quantifying bacteria using the PCR technique including the primers (1) and (2) described below. (1) A forward primer comprising a base sequence of 10 or more bases composed from a portion of a specific base sequence; and (2) a reverse primer comprising a base sequence of 10 or more bases composed from a portion of the complementary base sequence of another specific base sequence.

[Selected Drawings] None

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-201679

(P2004-201679A)

(43) 公開日 平成16年7月22日(2004.7.22)

(51) Int. Cl.⁷

C12Q 1/68

C12N 15/09

F1

C12Q 1/68

C12N 15/00

ZNAA

A

テーマコード(参考)

4B024

4B063

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2003-403715 (P2003-403715)
 (22) 出願日 平成15年12月2日(2003.12.2)
 (31) 優先権主張番号 特願2002-358698 (P2002-358698)
 (32) 優先日 平成14年12月10日(2002.12.10)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(71) 出願人 000000918
 花王株式会社
 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番1
 O号
 (74) 代理人 100104499
 弁理士 岸本 達人
 (74) 代理人 100101203
 弁理士 山下 昭彦
 (74) 代理人 100108800
 弁理士 星野 哲郎
 (72) 発明者 岩瀬 忠行
 東京都墨田区文花2-1-3 花王株式会
 社研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PCR法によるフゾバクテリウム・ニュークレタム菌の検出用プライマー及びその検出方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 生体試料中から化膿性疾患関連細菌及び口実原因菌であるフゾバクテリウム・ニュークレタム菌を特異的に検出する方法を提供する。

【解決手段】 下記(1)及び(2)のプライマーを含む、PCR法による細菌の検定及び/又は定量の方法。(1) 特定の塩基配列の一部からなる少なくとも10塩基以上の塩基配列を有するフォワードプライマー(2) 他の特定の塩基配列の相補的塩基配列の一部からなる少なくとも10塩基以上の塩基配列を有するリバースプライマー。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記(1)及び(2)のプライマーを含む、PCR法によるフソバクテリウム・ニュークレタム菌の検出及び/又は定量の方法。

(1) 配列番号1に記載の塩基配列の一部からなる少なくとも10塩基以上の塩基配列を有するフォワードプライマー

(2) 配列番号2に記載の塩基配列の相補的塩基配列の一部からなる少なくとも10塩基以上の塩基配列を有するリバースプライマー

【請求項2】

下記プライマー(A)とプライマー(B)とを含むPCR法によるフソバクテリウム・ニュークレタム菌の検出用プライマーセット。

(A) 配列番号3に記載の塩基番号第1番目乃至第39番目の塩基配列又はその一部からなる少なくとも10塩基以上の塩基配列を有するプライマー

(B) 配列番号3に記載の塩基番号第863番目乃至883番目の塩基配列の相補的塩基配列又はその相補的塩基配列の一部からなる少なくとも10塩基以上の塩基配列を有するプライマー

【請求項3】

下記プライマー(C)と請求項2記載のプライマー(B)とを含むPCR法によるフソバクテリウム・ニュークレタム菌の検出用プライマーセット。

(C) 配列番号3に記載の塩基番号第1番目乃至第18番目の塩基配列

【請求項4】

請求項2又は3に記載のプライマーセットを用い、フソバクテリウム・ニュークレタムのリボソーマルDNAを鋳型としたPCR法により得られた、フソバクテリウム・ニュークレタム菌に特異的な遺伝子増幅産物。

【請求項5】

標識物質によって標識されたプローブである、請求項4に記載の遺伝子増幅産物。

【請求項6】

前記標識物質が、ビオチン、ジゴキシゲン、FITC、アクリジン、シニトロフェニル、ルシフェラーゼ、アルカリフォスファターゼ及び $[^{32}P]$ dNTPから選ばれる少なくとも1種である請求項5に記載の遺伝子増幅産物。

【請求項7】

請求項2に記載のプライマー(A)と(B)とを含むプライマーセットを用いてPCRを行う第1ステップと、

前記第1ステップによって増幅された産物を鋳型として用い、請求項2に記載のプライマー(A)、及び、下記プライマー(D)又は(E)、を含むプライマーセットを用いてPCRを行う第2ステップと、
を含むフソバクテリウム・ニュークレタム菌の検出方法。

(D) 配列番号3に記載の塩基番号第124番目乃至156番目の塩基配列の相補的塩基配列又はその相補的塩基配列の一部からなる少なくとも10塩基以上の塩基配列を有するプライマー

(E) 配列番号3に記載の塩基番号第124番目乃至143番目の塩基配列の相補的塩基配列

【請求項8】

配列番号4に記載の塩基配列の一部からなる少なくとも10塩基以上のプライマーと請求項2に記載のプライマー(B)とを含むプライマーセットを用いてPCRを行う第1ステップと、

前記第1ステップによって増幅された産物を鋳型として用い、請求項2に記載のプライマー(A)および請求項7に記載のプライマー(D)を含むプライマーセットを用いてPCRを行う第2ステップと、
を含むフソバクテリウム・ニュークレタム菌の検出方法。

10

20

30

40

50

【請求項 9】

請求項 2 に記載のアライマー (A) と請求項 7 に記載のアライマー (D) 又は (E) を用い、配列番号 5 の塩基配列を含む DNA を鋳型とした PCR 法により得られた、フソバクテリウム・ニュークレタム菌に特異的な遺伝子増幅産物。

【請求項 10】

配列番号 5 の塩基配列からなるプローブ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、歯肉線下歯垢や歯肉線下歯垢、舌苔、唾液、歯肉溝 出血、血液、髄液、化膿部位やその他の組織等の生体試料中から化膿性疾患関連細菌及び口臭原因菌であるフソバクテリウム・ニュークレタム菌を特異的に検出する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、細菌の同定は培養法を用いて行うことが一般的であり、増殖培養、分離培養等を行ってシングルコロニーを生育させる必要があるため、数日から数週間を要していた。さらにその後、単離した菌を増殖させ、形態観察、グラム染色等による細胞染色、およびプロピオン酸産生試験、糖質化性等多くの生化学的性状を調べる必要があり、培養法による細菌の同定には、設備、時間、費用を要した。

【0003】

前記培養法の欠点を克服する方法として、近年、PCR 法による細菌同定が行われるようになった。PCR 法を用いることにより細菌同定は迅速かつ鋭敏に行えるようになったが、PCR 法はアライマーが不可欠であり、目的とする細菌を検出・同定できるかはアライマー設計にかかっていた。

【0004】

一方、ヒト口腔から分離されるフソバクテリウム属として、フソバクテリウム・ナヴィフォルム (*F. naviforme*)、フソバクテリウム・ペリオドンティカム (*F. periodonticum*)、フソバクテリウム・ネクロフォーラム (*F. necrophorum*)、フソバクテリウム・ヴァリウム (*F. varium*)、フソバクテリウム・ニュークレタム菌 (*Fusobacterium nucleatum*、以下、F.n 菌という。)、フソバクテリウム・ルーシー (*F. russii*) 等が知られている。

【0005】

口臭原因菌とも言われている F.n 菌は、食物残 や剥離粘膜等に含まれる含硫アミノ酸や含硫アミノ酸を含むペプチド等を分解し揮発性硫化化合物 (以下 VSC という) を生産するのに対し、F.n 菌以外の前記フソバクテリウム属の菌の VSC 産生能は F.n 菌ほど高くない。また、F.n 菌は、歯周病原菌であるボルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*) やアレボテラ・インターメディア (*Prevotella intermedia*) 等の歯周病原菌と共に凝集する特有の性質を有するため、歯周疾患との関連も示唆されている。

【0006】

このように、フソバクテリウム属の中で F.n 菌は特に重要な菌種である。しかし、F.n 菌は、フソバクテリウム属の他種と極めて近い類縁関係にあるため、それを分離培養することが困難であり、これまで F.n 菌だけを検出することのできる選択培地は開発されていない。

【0007】

また、F.n 菌種を検出同定するための試みとして、検体となる微生物の 16S リボソーム DNA (以下 16S rDNA という) を抽出し、この DNA と相補関係にある数十の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをアライマーとした PCR 法による細菌の検出方法が報告されている (非特許文献 1)。しかし、前記 PCR 法では F.n 菌のみを検出することはできなかった。

【0008】

【非特許文献1】Conrads, G. et al, J. Endodontics, 25:433-438, 1997

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、フソバクテリウム属細菌の中でFfn菌を特異的に区別し、かつ、生体試料に混入されるヒト由来DNAと明確に区別しうる簡便かつ迅速な検出方法を提供することを目指すとする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

発明者らは、Ffn菌のrDNAを検討した結果、16SrDNAはフソバクテリウム属の近縁種間を極めて酷似しており、16SrDNAの中でプライマーを作成しPCR法を行ってもFfn菌の検出・同定は困難であることがわかった。一方、23SリボソームRNA（以下23SrDNAという）はヒトの遺伝子DNAと類似しているため、歯肉線下歯垢や歯肉線下歯垢、唾液等の生体試料を分析する点で望ましくない。

そこで、「16SrDNA及び/又はスパーサー部位(配列番号1)の一部を有するフォワードプライマー」と「23SrDNA(配列番号2の相補鎖)の一部を有するリバースプライマー」を組み合わせてPCRすることにより初めて、生体試料に混入されるヒト由来DNAと明確に区別し、さらにFfn菌を特異的に区別しうる簡便かつ迅速な検出が可能となった。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明において、配列番号1に記載の塩基配列の一部からなる少なくとも10塩基以上の塩基配列を有するフォワードプライマーとは、当該フォワードプライマー自体の全配列又は部分的配列として、配列番号1で表される塩基配列の少なくとも一部に相当する塩基配列であり且つ少なくとも10塩基分の長さを有するプライマーである。

より具体的には、当該フォワードプライマーは、3'末端に配列番号1記載の塩基配列の一部を含むプライマーであり、その5'末端に配列番号1で表される塩基配列とは全く関係ない付加的な塩基配列により延長されていても良い。

当該フォワードプライマーは、配列番号1の相補的塩基配列と後述するPCR法条件下でハイブリダイズし、ヒト由来正常歯肉繊維芽細胞由来のDNAとハイブリダイズしないものであれば特に限定はないが、プライマーのデザインは以下の条件に適合するものが望ましい。プライマーの鎖長としては、10塩基以上40塩基以下のものが好ましく、より好ましくは12塩基以上30塩基以下であり、特に好ましくは15塩基以上25塩基以下である。

Tm値は40℃以上、65℃以下になるよう設計するが、より好ましくは50℃以上80℃以下である。GC含量は25%以上、70%以下になるよう設計することが好ましく、より好ましくは40%以上80%以下である。

上記フォワードプライマーとして好ましい配列としては、例えば、GTTTGTATCC TGGCTCAG(配列番号11)、CTTAACACATGCAAGTC(配列番号12)、AATGCTTAAACACATGCAAGTC(配列番号13)、TCCCTACG GGAGGCAGCAGT(配列番号14)、GTCTTGTTACACACCGCCC(配列番号15)等を挙げることができる。

【0012】

配列番号2に記載の塩基配列の相補的塩基配列の一部からなる少なくとも10塩基以上の塩基配列を有するリバースプライマーとは、当該リバースプライマー自体の全配列又は部分的配列として、配列番号2で表される塩基配列の少なくとも一部に相当する塩基配列の相補的塩基配列であり且つ少なくとも10塩基分の長さを有するプライマーである。

より具体的には、当該リバースプライマーは、3'末端に配列番号2記載の塩基配列の相補的塩基配列の一部を含むプライマーであり、その5'末端に配列番号2で表される塩基配列の相補的塩基配列とは全く関係ない付加的な塩基配列により延長されていても良い

10

20

30

40

50

当該リバースプライマーは、配列番号2のDNAと後述するPCR法の条件下でハイブリダイズし、フソバクテリウム・ペリオドンティカム (*F. periodonticum* ATCC 33693)、フソバクテリウム・ネクロフォーラム (*F. necrophorum* ATCC 25286) 及びフソバクテリウム・ヴァリウム (*F. varium* ATCC 8501) の238bp DNAとハイブリダイズしないものであれば特に限定はないが、プライマーのデザインは以下の条件に適合するものが望ましい。

プライマーの鎖長としては、10塩基以上40塩基以下のものが好ましく、より好ましくは12塩基以上30塩基以下であり、特に好ましくは15塩基以上25塩基以下である。Tm値は40℃以上、65℃以下になるよう設計するが、より好ましくは50℃以上60℃以下である。GC含量は25%以上、70%以下になるよう設計することが好ましく、より好ましくは40%以上60%以下である。

上記リバースプライマーとして好ましい配列としては、例えばGCCATCACCCAAATGG (配列番号16)、AAGAAGGGTAACCGACTT (配列番号17) 等を得ることができる。

【0013】

特に、生体試料からFf菌を特異的に検出する点で下記プライマー(A)と(B)、もしくは(B)と(C)を組み合わせたプライマーセットを用いることが好ましい。

(A) 配列番号3に記載の塩基番号第1番目乃至第39番目の塩基配列又はその一部からなる少なくとも10塩基以上の塩基配列を有するプライマー

(B) 配列番号3に記載の塩基番号第863番目乃至883番目の塩基配列の相補的塩基配列又はその相補的塩基配列の一部からなる少なくとも10塩基以上の塩基配列を有するプライマー

(C) 配列番号3に記載の塩基番号第1番目乃至第18番目の塩基配列

【0014】

Ff菌由来DNAだけでなく、ヒト由来DNAが含まれている生体試料のPCRを行うため、一般細菌とヒト由来DNAを区別する領域として特に好ましい配列として塩基配列(A)の1つである配列番号3に記載の塩基番号第1番目乃至39番目の塩基配列を見出した。この塩基配列は、168bp DNAの3'末端の5塩基および、前記5塩基に隣接する168bp DNAと238bp DNAとの間に構成されるスプーサー領域の5'末端の塩基配列からなる部位に存在していた。

【0015】

次にPCR法で増幅するための前記のオリゴヌクレオチドプライマーを設計し合成した。これらのプライマーを用いて、Ff菌が存在する生体試料についてPCRを行うとき、Ff菌に特異的な増幅産物のみが得られる。

【0016】

Ff菌検出可能な検体としては、歯肉縁上歯垢や歯肉縁下歯垢、舌苔、唾液、歯肉溝出血等の口腔関連の生体試料を用いることができる。さらには血液、髄液、粘膜部位やその他の組織等の生体試料でもよい。また、プライマーに用いるオリゴヌクレオチドは化学合成されたものでも天然物由来のものでも使用可能である。

【0017】

好ましいプライマー(A)～(C)について説明する。プライマー(A)に該当する、配列番号3に記載の塩基番号第1番目乃至第39番目の塩基配列又はその一部からなる少なくとも10塩基以上の塩基配列を有するプライマーをフォワードプライマーとして用い、プライマー(B)に該当する配列番号3に記載の塩基番号第863番目乃至883番目の塩基配列の相補的塩基配列又はその相補的塩基配列の一部からなる少なくとも10塩基以上の塩基配列を有するプライマーをリバースプライマーとしてPCRを行うことができる。プライマーの鎖長としては、10塩基以上40塩基以下のものが使用され、好ましくは12塩基以上30塩基以下であり、より好ましくは15塩基以上25塩基以下である。塩基配列(A)としては、例えば18塩基からなる塩基配列(C) AACGTGCGGA

TGGATCACや、塩基配列(A)における塩基番号第1番目乃至第2番目の塩基配列AACGTGCGGATGGATCACCTTCCや、塩基番号第7番目乃至第8番目の塩基配列CGGATGGATCACCTTCTTCC、塩基番号第12番目乃至第31番目の塩基配列GGATCACCTTCTTCTTAAGG、塩基番号第16番目乃至第33番目の塩基配列CACCTTCTTCTTCTTAAGGAG等を用いることができる。塩基配列(B)の1種(配列番号3に記載の塩基番号第863番目乃至第883番目の塩基配列の相補的塩基配列)および(C)のプライマーを用いてPCRを行った場合、配列番号3の塩基配列の増幅産物を特異的に得ることができる。主要な増幅産物の長さは、計算上883bpであり、塩基泳動像で増幅産物を示す約900bpのバンドが確認できる(図2参照)

【0018】

また、試料中のFn面数が極めて少ない場合や、より明瞭な電気泳動像を得たい場合には、前記プライマー(A)、(B)とプライマー(D)に該当する、配列番号3に記載の塩基番号第124番目乃至第156番目の塩基配列の相補的塩基配列又はその相補的塩基配列の一部からなる10塩基以上の塩基配列を含むプライマーの3つのプライマーを用いてセミネスティットPCR法を行うことができる。塩基配列(D)は168bpDNAと238bpDNAとの間のスぺーサー領域と呼ばれる部位に存在する。塩基配列(D)としては29塩基からなるものであってもよく、プライマーとしてより好適な15~25塩基、例えば20塩基からなる塩基配列を有するプライマー(E)等を用いることが好ましい。ここで、プライマー(E)とは、配列番号3に記載の塩基番号第124番目乃至第143番目の相補的塩基配列を有するプライマーである。

セミネスティットPCR法は2段階の増幅ステップからなる。まず第1の増幅ステップで標的領域を含んだ増幅産物を得る。そして得られた増幅産物を鋳型に第2の増幅ステップを行うが、この時最初に使用したプライマー(アウトタープライマー)位置より、どちらか一方のプライマーだけ内側のプライマー(インナープライマー)を使用し、標的領域以外のDNA由来の増幅産物を除外することができる。第1の増幅ステップとして、前記(A)および(B)の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドをアウトタープライマーとしてPCRを行う。増幅処理を行ったサンプルの一部を用いて第2の増幅ステップに入る。第2の増幅ステップでは、前記(A)および(D)の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドをインナープライマーとして用いてPCRを行う。この場合の主要な増幅産物は、第2の増幅ステップで用いたプライマーに依存するため、配列番号3に記載の塩基配列の一部に相当する

【0019】

第1の増幅ステップに用いることができるアウトタープライマーとして、前記(A)の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドの他に、168bpDNAの塩基配列を基に設計した例えばCGTCCACACACGAGAGTTGG(配列番号1に記載の塩基番号第1384番目乃至第1403番目の塩基配列)等を用いることもできる。あるいは(B)の塩基配列を含むプライマーの他に238bpDNAの塩基配列を基に設計した例えばCCATTGGGTGATGGC(配列番号2に記載の塩基番号第597番目乃至第612番目の塩基配列)の相補的塩基配列をアウトタープライマーとして用いることができる。

【0020】

また、セミネスティットPCR法に代えてネスティットPCR法も適用が可能である。ネスティットPCR法は、セミネスティットPCR法と比較して、両側とも内側のインナープライマーセットを使用する点が異なる。

【0021】

ネスティットPCR法に使用可能なアウトタープライマーとして、前記の(C)や(B)の塩基配列の他に、下記のものを用いることができる。フォワードプライマー:配列番号4に記載の塩基配列の一部からなる少なくとも10塩基以上の塩基配列、又は、配列番号3に記載の塩基番号第1番目乃至第123番目の塩基配列の一部からなる少なくとも10塩基以上の塩基配列を有するプライマー

リバースプライマー：238bp DNA（配列番号2の相補鎖）の一部からなる少なくとも10塩基以上の塩基配列を有するプライマー

例えば、アウトワープライマーとして、168bp DNAの塩基配列を基に設計したCGTCACACCACGAGAGTTGG（配列番号4に記載の塩基番号第1384番目乃至第1403番目の塩基配列）と、238bp DNAの塩基配列のうち、AAGAGAGGTTAACCGACTT（配列番号2に記載の塩基番号第1256番目乃至第1273番目の塩基配列）の相補的塩基配列とを用いて第1ステップの増幅を行うことができる。この場合、Fh菌を特異的に検出するためには、本発明のプライマー（A）と（B）のプライマーセット又はプライマー（B）と（D）のプライマーセットをインナープライマーとして用いることが好ましい。

【0022】

本発明においてPCR法とは、当業者が通常実施する遺伝子増幅方法であるが、以下にその概略を説明する。

鋳型となる2本鎖のDNAを加熱によって、それぞれ、1本鎖DNAに分離（熱変性）させる。その後、アニールによって、標的領域を挟むように、プライマーと呼ばれるオリゴヌクレオチドを前記熱変性によって分離された相補関係にあるそれぞれの1本鎖の5'末端にハイブリッド結合させる（アニーリング）。基質である4種類のdNTP（デオキシリボヌクレオチド3燐酸）の存在下、Taq DNAポリメラーゼを作用させると、このプライマーの3'末端に鋳型の塩基配列に従ってヌクレオチドが添加されDNA鎖が伸長する（伸長反応）。この反応を繰り返すことで、標的領域を含むDNA断片を大量に得ることができる。なお、プライマーの合成反応及び鎖長反応の基質としてdNTP中のdTTPの代わりにdUTPを用いても良い。

【0023】

本発明におけるPCR法の温度条件は、2本鎖DNAを1本鎖にする熱変性反応を90～98℃、プライマー鋳型DNAにハイブリッド結合させるアニーリング反応を37～65℃、Taq DNAポリメラーゼを作用させる伸長反応を50～75℃で行い、これを1サイクルとし、このようなサイクルを数十サイクル行わせることで、標的配列を増幅させることが好ましい。PCR後、増幅産物を電気泳動等により分離し、エチジウムブロマイド等で核酸染色を行い、増幅されたポリヌクレオチド配列の鎖長が、上述の標的配列の鎖長と等しければ検体中に検出対象の菌が存在すると判定できる。増幅されたポリヌクレオチド配列の検出には、高速液体クロマトグラフィーも有効である。

【0024】

プライマー鎖長が、本発明において必須の配列部分（例えば、プライマーAにおいては配列番号3の塩基番号第1番目から第39番目の塩基配列又はその一部からなる少なくとも10塩基以上の配列に相当する部分、また、プライマーBにおいては配列番号3に記載の塩基番号第83番目から883番目の塩基配列の相補的塩基配列又はその相補的塩基配列の一部からなる少なくとも10塩基以上の配列に相当する部分）の5'末端が付加的な配列により延長されている場合には、鎖長追加分が増幅産物に賦与される。逆に、5'末端が短いものを用いたときには、その欠失分だけ増幅産物が短くなる。プライマーは、デオキシ、ジゴキシゲニン、FITC（Fluorecein Isothiocyanate）、アクリジン、ジニトロフェニル、アルカリフォスファターゼ、ルシフェラーゼ、 $[^{32}\text{P}]$ dNTPから選ばれた一つ以上を用いて標識されてもよい。

【0025】

本発明に供するサンプルとして、様々な生体試料が考えられるが、例えば唾液、舌苔、歯肉線下歯垢、歯肉線下歯垢、口腔内粘膜、歯肉溝、唾液、血液、髄液、化膿性疾患部位の検体、糞便、尿、あるいはそれら生体試料の培養物等を受けることができる。

【0026】

採取した生体試料は、直接あるいはDNA抽出後PCRに供することができる。DNA抽出は、常法に従って行うことができる。例えば、アルカリ抽出もしくは界面活性剤抽出、酵素処理、ホイリング法等のうちいずれか一つ以上の方法、もしくは市販のキットを用

10

20

30

40

50

いてDNA抽出を行う。

【0027】

生体から抽出されたDNAを含む試料は、常法に従って更に精製処理をしてもよい。例えば高速液体クロマトグラフィーもしくはアルコール沈殿、塩析、シリカゲルカラム、シリカゲルメンブレン等のうちのいずれが一つ以上の方法、もしくは市販のキットを用いて、DNA精製する。

【0028】

前記のアライマーや増幅産物は、F_h菌検出のためのアローブとしても有用である。増幅産物は制限酵素等を用いて、適当な長さのDNA断片にしてもよい。制限酵素としてEcoRI、MseI、BamHI、AluI、MboI、FokI、TaqI、MboII、HinfI、AvaIIから一つ以上を用いることができる。制限酵素処理して得られたDNA断片は、電気泳動や高速液体クロマトグラフィー、シリカゲルカラム、シリカゲルメンブレン、ナイロンメンブレン等を用いて精製することが望ましい。

【0029】

これらのアローブは標識物質で標識することも可能である。標識物質としてビオチン、ジゴキシゲン、FITC(Fluorescein Isothiocyanate)、アクリジン、ジニトロフェニル、アルカリフォスファターゼ、ルシフェラーゼ、[³²P]dNTPから選ばれ一つ以上を用いてアローブを標識することが可能である。

【0030】

これらのアローブは支持担体に結合させ、DNAチップとして用いることができる。DNAチップの作製等については、常法に従って実施することができる。例えば、アローブをチップ基板上に配置させるアローブ配置型や、ガラスやシリコンなどの基板上に直接DNAの伸長反応を用いてアローブDNAを生成させたアローブ合成型などを用いてもよい。また、市販のDNAチップ作製装置及びその読み取りには、DNAチップ読み取り装置等を用いてもよい。

【0031】

菌検出又は同定用キットは、本発明のアローブおよび/またはアライマーを含む。さらに他の成分としてTaq DNAポリメラーゼ、その他の酵素、dNTP等の基質、緩衝液等を含む。

【実施例】

【0032】

以下に実施例を挙げて、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明は実施例のみに限定されるものではない。

<実施例1>F_h菌の検出1

下記アライマーを用いて、フソバクテリウム・ニュークレタム標準菌の検出を行った。

フォワードアライマー：5'-AACGTGCGGATGGATCAC-3'

リバースアライマー：5'-CTACGCCAAACGACTAATTTCG-3'

3種類のフソバクテリウム・ニュークレタム菌標準株(Fusobacterium nucleatum ATCC25586、ATCC10953、ATCC23726)を、変法FM培地(日本製薬株式会社製)上に73~85日間37℃で嫌気培養を行い、出現したコロニーを1白金耳分採取し市販キット(キアゲン社製DNAミニキット)を用いてDNA抽出液を得た。DNA抽出液1μlに50mMのMgCl₂溶液を1.5μl、各2mMのdNTP溶液(アフライドバイオシステム社製)2μl、12.5pmol/μlのフォワードアライマー溶液1μl、12.5pmol/μlのリバースアライマー溶液1μl、5U/μlのTaq DNAポリメラーゼ溶液(アフライドバイオシステム社製)0.5μl、AmpliTaq Gold緩衝液(アフライドバイオシステム社製)5μlをそれぞれ加え、更に滅菌した超純水を全量50μlになるよう加えて反応液とした。

【0033】

PCRの反応条件は、以下の通りである。

熱変性：94℃、30秒

10

20

30

40

50

アニーリング： 55℃、30秒
 伸長反応： 72℃、30秒
 反応サイクル： 40回

【0034】

これらの操作は、アフライド・バイオシステム社製のGeneAmp 9700システムを用いて行った。増幅産物の有無は、常法のアガロース電気泳動法に従った。電気泳動のためのアガロースゲルを用意し、TAE (Tris acetate, Ethylenediamine Tetraacetic Acid) バッファーを満した泳動装置にセットし、PCR反応物を試料溝にセットした。100V、15分間泳動した後、アガロースゲルをエチジウムブロマイド溶液に30分浸漬し、核酸を染色した。染色後、UVトランスイルミネーターを用いて、増幅産物のバンドを確認した。電気泳動の結果は図2の通りである。図中のレーン1はマーカー、レーン2はATCC 25586株、レーン3はATCC 10953株、レーン4はATCC 23726株の電気泳動像を示す。3菌種のフソバクテリウム・ニュークレタム菌全てに約900bpの増幅産物を示すバンドが認められた。

【0035】

<実施例2> F.n菌の検出

下記プライマーを用いて、実施例1同様の試験を行った。

フォワードプライマー：5' -GGATTAGATACCCCTGGTAGTTC-3'

リバースプライマー：5' -GCCATCACCACCAATGG-3'

フソバクテリウム・ニュークレタム (ATCC 25586株) において約1500bpの増幅産物を示すバンドが認められた。

【0036】

<比較例1> F.n菌以外のフソバクテリウム属細菌およびヒト由来細胞のPCR

供試菌体および供試細胞はとして、F.n菌以外の5菌種、すなわちフソバクテリウム・ナヴィフォルム (F. naviforme ATCC 25832)、フソバクテリウム・ペリオドンチカム (F. periodonticum ATCC 33893)、フソバクテリウム・ネクロフォーラム (F. necrophorum ATCC 25286)、フソバクテリウム・ヴァリウム (F. varium ATCC 8501) 及び、フソバクテリウム・ルーザー (F. russii ATCC 25533) と、ヒト由来正常歯肉繊維芽細胞 (Normal Gingiva Fibroblast ATCC CRL 1292) を供試した。

【0037】

ヒト由来正常歯肉繊維芽細胞は、改良イーグルス培地 (Dulbecco社製) に10%のウシ胎児血清を加えた培地中で、5%CO₂の気相条件下、37℃、72時間培養後回収し、生理食塩水で洗浄後DNA抽出を行った。それ以外の菌株については、実施例1同様の操作を行った。電気泳動の結果は図3の通りである。レーン1はマーカー、レーン2はフソバクテリウム・ナヴィフォルム、レーン3はフソバクテリウム・ペリオドンチカム、レーン4はフソバクテリウム・ネクロフォーラム、レーン5はフソバクテリウム・ヴァリウム、レーン6はフソバクテリウム・ルーザー、レーン7はヒト由来正常歯肉繊維芽細胞の電気泳動像を示す。いずれのレーンにも増幅産物を示すバンドは認められなかった。

【0038】

<実施例3> 生体試料のPCRの実施

1. 試料の調製

被験者5名から生体試料として、唾液、舌苔、歯肉縁下歯垢および口腔粘膜を採取した。それぞれの採取方法は下記の通りである。

(1) 唾液の場合

1mlの唾液を採取し、5000gで5分間遠心分離した。上清を捨て、PBS (Phosphate buffered saline : 磷酸緩衝生理食塩水) 1mlを加え、再懸濁した。この操作を3回繰り返し、洗浄したものをDNA抽出に供試した。

(2) 舌苔の場合

舌ブラシで舌を擦過し、舌苔を採取した。得られた舌苔中10mgを分取し、これに1m

10

20

30

40

50

1) のPBSを加えて懸濁後5000gで5分間遠心分離した。上清を捨て更に1mlのPBSを加え再懸濁後5000gで5分間遠心分離した。この操作を3回繰り返し、洗浄したものをDNA抽出に供試した。

【0039】

(3) 歯肉線下歯垢の場合

歯肉ポケット部位に対しペーパーポイント(United Dental Manufacturers Inc. 製)2本を差し込み、歯肉線下歯垢を採取した。このペーパーポイントを1mlのPBS中で強く1分間ホルテックスし、付着物を回収した。ペーパーポイントを取り除いた後、懸濁液を5000gで5分間遠心分離した。上清を捨て更に1mlのPBSを加え再懸濁後5000gで5分間遠心分離した。この操作を3回繰り返し、洗浄したものをDNA抽出に供試した。

(4) 口腔粘膜の場合

シードスワブを用いて、頬粘膜を採取した。採取物を1mlのPBSにて懸濁した。懸濁液を5000gで5分間遠心分離した。上清を捨て更に1mlのPBSを加え再懸濁後5000gで5分間遠心分離した。この操作を3回繰り返し、洗浄したものをDNA抽出に供試した。

【0040】

それ以外は、実施例1同様の操作を行った。電気泳動の結果は図4(1)~(4)の通りである。図4(1)は唾液からの検出結果、図4(2)は舌苔からの検出結果、図4(3)は歯肉線下歯垢からの検出結果、図4(4)は口腔粘膜からの検出結果を示す。各図のレーン1はマーカー、レーン2は被験者A、レーン3は被験者B、レーン4は被験者C、レーン5は被験者D、レーン6は被験者Eからの採取試料の電気泳動像を示す。唾液に関しては、5名中3名に、舌苔に関しては、5名中4名に、歯肉線下歯垢に関しては5名全員に、口腔粘膜に関しては5名中1名に約900bpのバンドが認められた。

【0041】

<実施例4>生体試料の定量PCRの実施

実施例3の歯肉線下歯垢試料を用いて、定量PCRを行った。核酸定量試薬としてSYBR Green (Molecular Probe社製)を3000倍希釈したものを5μl供試した。下記のプライマーを12.5PMの濃度になるように適量した超純水で希釈したものを1μl用いた。それ以外の試薬は実施例1の反応液組成の通りである。これらを混ぜ合わせて反応液を調製し、アプライドバイオシステム社製ABIファズム7000システムを用いて定量PCRを行った。結果を表1に示した。

フォワードプライマー: 5'-AACGTGCGGATGGATCAC-3'

リバースプライマー: 5'-TCTAAAGAAATTGTTTAGAG-3'

【0042】

【表1】

表1

被験者	細菌数 (copies/採取部位)
A	1.9E+04
B	5.8E+06
C	2.5E+04
D	3.1E+02
E	8.0E+01

【0043】

＜実施例5＞生体試料のセネスティットPCRの実施

下記のプライマーを用いて、2段階のPCRから成るセネスティットPCRを行った

第1ステップのPCRに供試したプライマー：

フォワードプライマー：5'-AACGTGCGGATGGATCAC-3'

リバースプライマー：5'-CTACGCCAAACGACTAATTTCG-3'

第2ステップのPCRに供試したプライマー：

フォワードプライマー：5'-AACGTGCGGATGGATCAC-3'

リバースプライマー：5'-TCTAAAGAAATTGTTTAGAG-3'

10

【0044】

生体試料として実施例3の唾液を用いた。第1ステップおよび第2ステップのPCRとも40サイクルの増幅を行った。それ以外は実施例1と同様の操作を行った。電気泳動の結果を図5に示した。図中のレーン1はマーカー、レーン2は被験者A、レーン3は被験者B、レーン4は被験者C、レーン5は被験者D、レーン6は被験者Eからの採取試料の電気泳動像を示す。5名中3名に増幅産物を示すバンドが検出された。

【0045】

＜実施例6＞生体試料のネスティットPCRの実施

下記のプライマーを用いて、2段階のPCRから成るセネスティットPCRを行った

20

第1ステップのPCRに供試したプライマー：

フォワードプライマー：5'-CGTCACACCACGAGAGTTGG-3'

リバースプライマー：5'-CTACGCCAAACGACTAATTTCG-3'

第2ステップのPCRに供試したプライマー：

フォワードプライマー：5'-AACGTGCGGATGGATCAC-3'

リバースプライマー：5'-TCTAAAGAAATTGTTTAGAG-3'

結果は実施例5と同様であった。

【0046】

＜実施例7＞Fn菌に特異的なフローを用いたDNAチップ

実施例1において得られたフローを常法により蛍光標識し、ガラス板に吸着させた。これを実施例3の唾液試料から得られたDNAと反応させた。結果を表2に示した。

30

【0047】

【表2】

表2

被験者	Fn菌の検出
A	検出
B	検出
C	検出
D	検出せず
E	検出せず

40

【0048】

＜実施例8＞Fn菌に特異的なフローを用いた検出キット

実施例1において得られたフローを常法により蛍光標識し、ガラスビーズに吸着させ

50

た。これを実施例3の唾液試料から得られたDNAと反応後、常法に従って発色させた。結果を表3に示した。

【0049】

【表3】

表3

被験者	F n 菌の検出
A	検出
B	検出
C	検出
D	検出せず
E	検出せず

10

【図面の簡単な説明】

【0050】

20

【図1】 tRNAをコードするDNAの構成を示す図である。

【図2】 実施例1におけるフソバクテリウム・ニュークレタム菌のPCR増幅産物の電気泳動像である。

【図3】 フソバクテリウム・ニュークレタム菌以外のフソバクテリウム属細菌とヒト由来細胞における増幅産物の電気泳動像である。

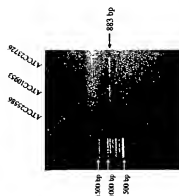
【図4】 生体試料におけるPCRの結果である。(1)唾液、(2)舌苔、(3)歯肉縁下歯垢、(4)口腔粘膜

【図5】 生体試料におけるセミネスティットPCRの結果である。

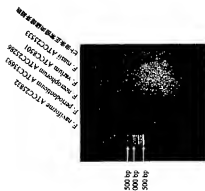
【 図 1 】



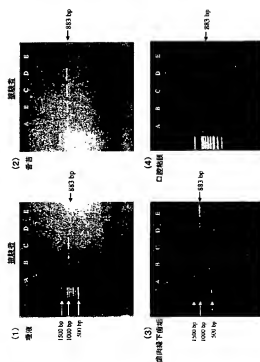
【 図 2 】



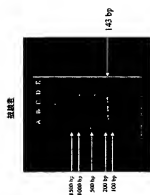
【 図 3 】



【 図 4 】



【図 5】



【配列表】

2004201679000001.app

BEST AVAILABLE COPY

フロントページの続き

(72)発明者 板野 守秀

東京都墨田区文花2-1-3 花王株式会社研究所内

(72)発明者 矢納 敏高

東京都墨田区文花2-1-3 花王株式会社研究所内

Fターム(参考) 4B024 AA13 CA01 CA09 HA12

4B063 QA18 GG06 GQ42 QR08 QR32 QR42 QR55 QR62 QS25 QS34

QX01